

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA GENERAL (1708)



EJERCICIO EXPERIMENTAL 7

Purificación de Anticuerpos

GRUPO: 01

EQUIPO: 05

INTEGRANTES:

- GONZÁLEZ MARTÍNEZ ULISES
- MORA TOLEDO DANIEL
- PINEDA CONTRERAS ITZEL NAYELI

PROFESORES:

- Q.F.B. GIBRÁN PÉREZ MONTESINOS
- E.B.C. JULIO CÉSAR MARTÍNEZ ÁLVAREZ

SEMESTRE
2016 – 1

INTRODUCCIÓN



La purificación de anticuerpos resulta importante para poder realizar pruebas inmunológicas posteriores para su identificación y cuantificación. Para tal efecto, el método de purificación de un anticuerpo puede variar dependiendo de su origen y el uso que se dará a dicho anticuerpo. Con base en lo anterior, los métodos de purificación de anticuerpos (γ – globulinas) pueden ser divididos en dos grandes categorías:

1. Inespecíficos: Son métodos que aprovechan las propiedades fisicoquímicas de los anticuerpos. Tales propiedades pueden ser: Carga eléctrica neta, solubilidad, tamaño y peso molecular, afinidad por ciertas proteínas.
2. Específicos: Son métodos que emplean las reacciones antígeno – anticuerpo como base de la purificación. Tales métodos pueden llevarse a cabo por: Adsorción, adsorción – elución y cromatografía por afinidad.

El origen de los anticuerpos purificados experimentalmente proviene de suero de conejo obtenido por punción cardiaca. El animal de experimentación fue sometido a un esquema de inmunización con suero humano por diferentes vías de administración durante 4 semanas.

El método empleado fue inespecífico, empleando precipitación fraccionada con sales neutras (experimentalmente: sulfato de amonio). La precipitación fraccionada con sales neutras es un método de purificación de anticuerpos en su estado natural (forma nativa). El sulfato de amonio es una sal altamente soluble a temperatura ambiente (20°C – 25°C) y el ion sulfato en disolución permite alcanzar altas fuerzas iónicas al ser divalente. Los anticuerpos, al ser proteínas, en solución son menos solubles cuando se aumenta la fuerza iónica, por lo que la concentración para precipitar anticuerpos es variable de tal forma que esta diferencia en sensibilidad resulta un método de purificación muy eficiente. Este método requiere de someter el suero a diálisis.

La diálisis es una técnica que se utiliza para separar moléculas de gran tamaño y peso, y se fundamenta en el hecho de que una membrana semipermeable permite el paso de moléculas pequeñas a través de ella, previniendo el paso así de los anticuerpos que tienen un alto peso molecular. Las moléculas pequeñas pasan a través de la membrana al fluido externo alcanzando un equilibrio. La mezcla puede liberarse casi completamente de moléculas pequeñas de dializado en contra de agua o cambiando en repetidas ocasiones el disolvente.

Entre los factores que favorecen la velocidad de diálisis son:

- La naturaleza de la membrana.
- Los disolventes o buffer empleados en la purificación.
- Condiciones físicas como temperatura y presión.

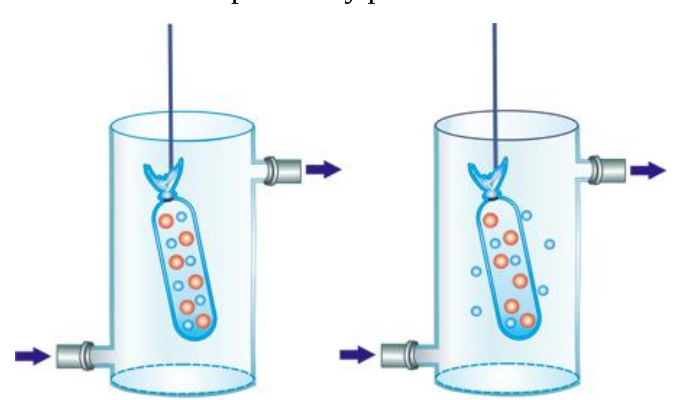


Figura No. 1. Ejemplificación de la técnica de diálisis para la purificación de anticuerpos por método de precipitación fraccionada con sales neutras.

OBJETIVOS

- Realizar la purificación de γ-globulinas anti-suero humano obtenidas por la inmunización de conejo mediante el método de precipitación fraccionada con sales neutras empleando la técnica de diálisis.

- Enriquecer la fracción de γ-globulinas anti-suero humano precipitándolas con sulfato de amonio saturado.

MATERIALES

Material Biológico	Equipo y Materiales	Reactivos
1. Suero de conejo con γ-globulinas anti-suero humano.	2. Agitador con magneto (1). 3. Centrifugadora (1). 4. Frasco de boca ancha (1). 5. Hilo cáñamo. 6. Jeringa de 5.0 mL con aguja (1). 7. Membrana para diálisis (1). 8. Pipeta de 10.0 mL (1). 9. Pipeta Pasteur con bulbo (2). 10. Tijeras (1). 11. Tubos Falcon (3). 12. Tuerca (1). 13. Vaso de precipitado de 100 mL (1). 14. Vaso de precipitado de 250 mL (1).	15. Buffer de boratos. 16. Disolución de $(NH_4)_2SO_4$ c.b.p. alcanzar concentración de saturación. 17. Disolución de NaOH 2.0 N 18. Disolución de BaO_2 o $Ba(OH)_2$ al 10 % 19. Solución Salina Isotónica.

MÉTODOLOGÍA

Agregar 30 mL suero de conejo y agitar constantemente.

→ Adicionar gota a gota $(NH_4)_2SO_4$ c.b.p. concentración de saturación.

Nota: Para 30 mL de suero, 15 mL de $(NH_4)_2SO_4$

→ Ajustar a pH 7.8 con NaOH 2.0 N

→ Agitar por 30 minutos

→ Centrifugar: 30 min / 3000 rpm

→ Descartar sobrenadante y resuspender con SSI (hasta volumen de 30 mL)

Este paso NO se realiza después de la segunda centrifugación.

→ ¿Cuántas veces se resuspendió en SSI?

- **Una vez** → (volver a adicionar $(NH_4)_2SO_4$)
- **Dos veces** → Repetir procedimiento sólo hasta la centrifugación.

→ Resuspender precipitado con buffer de boratos (hasta 15 ml)

→ Realizar diálisis para eliminar $(NH_4)_2SO_4$ por 8 días, realizando recambio diario de buffer de boratos en el exterior.

→ ¿Reacción negativa con BaO_2 o Ba $(OH)_2$?

- **NO** → Continuar diálisis hasta reacción negativa
- **SÍ** → Almacenar anticuerpo para estudios posteriores

RESULTADOS

Volumen obtenido de sangre de conejo (mL)	Volumen obtenido de suero (mL)	Reacción con $BaCl_2$
25	10	Negativa

CONCLUSIONES

- La purificación de γ-glubulinas a partir de una muestra de suero de conejo, obtenida por punción cardíaca, se realizó con un método inespecífico, basándonos en las propiedades de solubilidad del anticuerpo.

- La purificación de anticuerpos servirá para realizarle pruebas inmunológicas posteriores para su identificación y cuantificación.

- El método utilizado, precipitación fraccionada con sulfato de amonio, requirió someter el suero a diálisis para aumentar las probabilidades de que la alta concentración de sal en el tubo migre hacia la solución en la que se encuentra bañada el tubo y cuando se alcance el equilibrio, la concentración de sal en la muestra y la solución de diálisis sea muy baja. La prueba con $BaCl_2$ mostró ausencia de precipitado, lo que confirma la ausencia de iones sulfato en la fracción purificada.

REFERENCIAS

1. Allen T, Mark W. (2004). ***Desalting, Concentration, and Buffer Exchange by dialysis and ultrafiltration. Current protocols in protein science*** 4.4.1-4.4.15. John Wiley & Sons Inc, New York, USA.
2. Delves J.P., Martin S.J., Burton D.R. (2006). ***Inmunología: Fundamentos.*** 11a. Ed. México, Médica Panamericana, pp 129 – 131.
3. Voet D, Voet JG. (1995). ***Biochemistry.*** 2a. Ed. John Wiley & Sons Inc, New York, USA. pp 71-104.